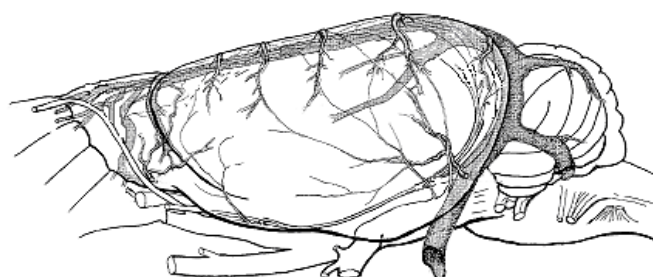


**NEUROGÉN ÉRREAKCIÓK PATKÁNY KEMÉNY AGYHÁRTYÁJÁBAN:
A CAPSAICIN-SZENZITÍV NOCICEPTÍV ÉRZŐ IDEGEK ÉS A FEJFÁJÁS LEHETSÉGES
KAPCSOLATA**

Ph.D. értekezés tézisei

ROSTA JUDIT



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET

SZEGED

2010

Bevezetés

A fejfájás az egyik leggyakoribb fájdalom, amely önálló kórfolyamatként, vagy betegségeket kísérő tünetként jelentkezik. Kialakulása elsősorban az agyat borító kemény agyhártya (dura mater encephali) patofiziológiai folyamatainak következménye. Az 1940-es években, Penfield és McNaughton éber pácienseken, helyi érzéstelenítésben végzett idegsebészeti műtétek során bizonyította, hogy a nagy meningeális artériák – mint az arteria meningea media (AMM) – környékének ingerlése, a stimulus típusától függetlenül fájdalomérzést vált ki. Megállapították, hogy az intrakraniális szövetek közül csak az agyalapi artériák és a dura mater rendelkezik érző beidegzéssel, amely főként az V. agyideg érző ganglionjából (ganglion trigeminale, TG) származik. A trigemino-vaszkuláris rendszernek fontos szerepet tulajdonítanak a fejfájások, elsősorban a migrén patomechanizmusában. Az értekezés a fejfájások kutatásában általánosan elfogadott kísérletes állatmodellen végzett vizsgálatokat foglal össze, amelyek elsősorban a capsaicin-szenzitív nociceptív érző idegeknek a dura mater neurogén vaszkuláris reakcióiban betöltött szerepének tisztázására irányultak.

A capsaicin-szenzitív, tranziens receptor potenciál vanilloid 1 típusú (TRPV1) receptort expresszáló primer afferens neuronok fájdalomérzésben, vaszkuláris és gyulladásos reakciókban betöltött szerepét az elmúlt évtizedek vizsgálatai sokoldalúan tisztázták. Megállapították, hogy a capsaicin-szenzitív érző idegek egyrészt alapvető szerepet játszanak a nociceptív ingerek közvetítésében, másrészt lokális (vazo-)regulatorikus működést fejtenek ki: ingerületi állapotukban a végződéseikből felszabaduló neuropeptidok révén befolyásolják a szövetek vaszkuláris és (neurogén) gyulladásos reakcióit. Jelen vizsgálataink döntően azon megfigyeléseken alapulnak, amelyekben kimutatták, hogy patkány kemény agyhártyájában a capsaicin-szenzitív (velőtlen) idegrostok kémiai ingerlése neurogén vazodilatációt vált ki, amelyet a TRPV1 receptor és az érző idegekből felszabaduló calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) közvetít (Dux et al. 2003).

Célkitűzések

Vizsgálataink célját a meningeális capsaicin-szenzitív nociceptív C-rostok további funkcionális és morfológiai karakterizálása, a capsaicin-szenzitív meningeális idegek működésének patológiás körülmények közötti vizsgálata, valamint ezen idegeknek a dura mater egyes vaszkuláris és nociceptív reakcióinak mechanizmusában betöltött szerepének tisztázása képezte.

Irodalmi adatok alapján ismeretes, hogy az átlag populációhoz viszonyítva cukorbetegekben gyakrabban jelentkezik fejfájás, ráadásul a cukorbetegség kialakulása jelentősen növeli a fejfájásos rohamok gyakoriságát és időtartamát is. Ezért streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabetes

mellitusban szenvedő állatokban megvizsgáltuk a neurogén szenzoros vaszkuláris reakciókat, valamint a capsaicin-szenzitív idegek egyes neurokémiai és morfológiai sajátosságait.

A dura mater kötőszöveti sejtjei között – részben perivaszkuláris lokalizációban – nagy számban mutattak ki hízósejteket, amelyeknek szerepet tulajdonítanak a migrénes fejfájást kísérő (neurogén) gyulladásos reakció kialakulásában (Moskowitz 1990). Újabban felismerték, hogy a hízósejtek által felszabadított triptázok a proteáz-aktivált receptorok (PAR) családjába tartozó PAR-2 receptorok aktiválása révén befolyásolhatják a peptiderg érző idegek működését (Steinhoff et al. 2000). Ezért megvizsgáltuk, hogy a capsaicin-szenzitív idegek szerepet játszanak-e a PAR-2 receptor aktiválódása következtében létrejövő véráramlás változásokban, és a PAR-2 receptor aktiválása befolyásolja-e a capsaicin-szenzitív idegek szenzoros vazomotor funkcióját, illetve a TRPV1 receptor nociceptív funkcióját?

Anyagok és módszerek

I. Capsaicin-szenzitív neurogén vaszkuláris reakciók vizsgálata lézer Doppler áramlásméréssel

Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez 300-350 g tömegű hím Wistar patkányokat használtunk. A vizsgált állatcsoportok kontroll, diabéteszes, inzulin-kezelt diabéteszes és capsaicin-deszenzibilizált csoportok voltak.

Az állatok egy csoportjánál a pancreas inzulintermelő B-sejtjeire toxikus hatású streptozotocin egyszeri, intravénás injekciójával (60 mg/kg) kísérletes diabetes mellitust idéztünk elő. Kontrollként a streptozotocin oldószerét (citrát-foszfát puffer, 0,1 M, pH 4) kapott állatok szolgáltak. A streptozotocinnal kezelt állatok egy csoportja a kezelés utáni 3. naptól napi egyszeri subcután inzulin-kezelésben (1 IU/100g) részesült.

A capsaicin-szenzitív C-rost afferensek szelektív degenerációját szisztémásan adagolt capsaicinnal váltottuk ki, az állatok három egymást követő napon 10, 20 illetve 100 mg/kg capsaicint kaptak subcután. A kontroll állatokat a capsaicin oldószerével kezeltük.

Az állatokat 2, 4 vagy 6 héttel a streptozotocin injekció után, illetve 4 nappal a capsaicin-kezelés befejezését követően használtuk fel kísérleteinkhez.

A dura mater feltárása és a meningeális érreakciók vizsgálata

In vivo kísérleteink során a szabaddá tett dura mater afferens idegrostjainak szelektív kémiai stimulálásával kiváltott véráramlás változásokat vizsgáltuk patkányokon. A kísérletek során az

artériás középnyomást és a rektális hőmérsékletet fiziológiás értéktartományban tartottuk. A barbituráttal altatott állatok koponyacsontját a parietális területen eltávolítottuk és az alatta fekvő dura matert feltártuk. Az AMM ágaiban a véráramlást lézer Doppler áramlásmérővel mértük. A dura mater felszínét szintetikus intersticiális folyadékkal (SIF) áramoltattuk át. A vizsgált anyagokat, a capsaicint és capsazepint kivéve, SIF-ban oldottuk és közvetlenül a felhasználás előtt hígítottuk a kívánt koncentrációra. A capsaicint és a capsazepint 32 mM-, illetve 1 mM-os, 6% etanolt és 8% Tween80-at tartalmazó törzsoldatából SIF-kal hígítottuk a megfelelő koncentrációra. A vizsgált anyagokat pipettával, 40 µl térfogatban a szabaddá tett dura mater felszínére juttattuk, majd a kísérlet típusától függően 3 vagy 5 perc múlva eltávolítottuk. Ezt követően a dura matert a véráramlás-értékek kiindulási szintre való visszatéréséig SIF-kal ismételtén átöblítettük. A vizsgált farmakonokkal kiváltott véráramlás változásokat az applikációt megelőzően mért alapáramláshoz viszonyítva értékeltük. Bizonyos esetekben vizsgáltuk a kiváltott hatások ismételhetségét is, a vizsgált anyag három egymást követő, ugyanazon dózisban történő applikációjával.

A vizsgált anyagok applikációját megelőzően receptor antagonistákat, illetve a nitogén monoxid (NO)-szintáz gátló Lω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride-ot (L-NAME) 10^{-4} - 10^{-5} M koncentrációban 5 vagy 15 percig lokálisan alkalmaztuk előkezelés formájában.

Capsaicin-szenzitív meningeális vaszkuláris reakciók vizsgálata

A capsaicin-szenzitív idegrostok által kiváltott érreakciók vizsgálatához a capsaicint emelkedő koncentrációban (5×10^{-8} - 10^{-5} M) alkalmaztuk. A capsaicin által kiváltott vaszkuláris reakciók mechanizmusának vizsgálatára a capsaicin applikációja előtt a specifikus TRPV1 antagonistá capsazepint (10^{-5} M), a nem-specifikus kation csatorna blokkoló ruténium vörös festéket (RR 10^{-5} M), illetve a CGRP receptor antagonistá CGRP₈₋₃₇ peptidet (10^{-5} M) juttattunk a dura mater felszínére.

A PAR-2 aktiváció által kiváltott meningeális érreakciók, a PAR-2 és a TRPV1 receptor közötti interakció vizsgálata

A természetes PAR-2 aktivátor tripszin (5×10^{-7} - 10^{-5} M), illetve a szelektív PAR-2 agonista Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-amide (SLIGRL-NH₂) peptid (10^{-6} - 10^{-4} M) meningeális véráramlásra kifejtett hatását vizsgáltuk lokális applikációt követően. A PAR-2 agonista által kiváltott érreakciókban szerepet játszó mechanizmusok felderítéséhez a SLIGRL-NH₂ applikációja előtt CGRP₈₋₃₇ peptiddel (10^{-5} M), illetve L-NAME-rel (10^{-4} M) történő előkezelést alkalmaztunk a dura mater felszínén. A capsaicin-szenzitív afferenseknek a PAR-2 aktiváció által kiváltott vaszkuláris reakciókban betöltött szerepét kontroll és capsaicin-deszenzibilizált állatokon vizsgáltuk. Meghatároztuk a SLIGRL-NH₂ (10^{-6} M) előkezelés hatását a capsaicin (10^{-8} M) által kiváltott vazodilatációs válaszra is.

A capsaicin-szenzitív meningeális vaszkuláris reakciók vizsgálata kísérletes diabetes mellitusban

Capsaicin (10^{-7} M) által kiváltott érreakciókat hasonlítottunk össze kontroll, diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes állatokban. A meningeális érreaktivitást hisztamin (HA 10^{-5} M) és acetilkolin (ACh 10^{-4} M) vazodilatációs hatásának mérésével ellenőriztük.

A meningeális véráramlás mérése és az adatok kiértékelése

A véráramlás változásokat az alapáramlás százalékában tüntettük fel. Az alapáramlás értékét a vizsgálandó anyag applikációja előtti 5 perces időintervallum átlagértéke adta meg. Értékeinket átlag \pm átlagszórás formában adtuk meg. Adataink kiértékeléséhez kétmintás t-próbát, illetve ANOVA tesztet használtunk. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

II. Capsaicin-szenzitív meningeális afferensek és a ganglion trigeminale neuronjainak immunhisztokémiai vizsgálata

Dura mater totálpreparátum

A kontroll és diabéteszes állatokat altatást követően 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk, majd dekapitáltuk. A bőrtől és izmoktól megtisztított koponyát a középvonalban kettévágtuk, az agyféltekéket kiemeltük. A parietális dura matert eltávolítottuk, majd 1 óra hosszan utófixáltuk. A preparátumokon TRPV1-immunhisztokémiai festést, illetve TRPV1-CGRP és TRPV1-PAR-2 kettős festést végeztünk.

Ganglion trigeminale metszetek

A perfundált állatok ganglionját eltávolítottuk, majd utófixáltuk. A ganglionokat 30%-os cukoroldatba tettük éjszakára, majd kriosztáttal 15 μ m vastagságú metszeteket készítettünk belőle. A tárgylemezre felvett metszeteken TRPV1-CGRP kettős immunhisztokémiai festést végeztünk.

Immunhisztokémia

A ganglion metszeteket és a dura mater totálpreparátumokat foszfát pufferben mostuk, majd 4°C-on egy éjszakán keresztül a primer antitesttel, vagy antitestekkel inkubáltuk: anti-TRPV1 (1:1000) és anti-CGRP (1:500), vagy anti-PAR-2 (1:200). Ezután a preparátumokat foszfát pufferrel történő mosást követően a FITC és/vagy CY3 jelölt szekunder antitesttel (1:500) inkubáltuk 2 órán keresztül. Ezt követően a dura mater preparátumokat tárgylemezre fektettük és valamennyi preparátumot lefedtük.

A preparátumokról digitális kamerával felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal felvételeket készítettünk. Az immunreaktív (IR) rostok számát és a ganglionsejtek morfológiai elemzését számítógépes program (Image-Pro Plus) segítségével végeztük. A TRPV1- és CGRP-IR rostok denzitásának meghatározásához a rostok cikloid mérővonalakkal alkotott metszéspontjainak számát határoztuk meg. A metszéspontok számát egy mintában minimum 10 mm²-es dura mater területen vizsgáltuk. Adataink statisztikai kiértékeléséhez kétmintás t-próbát használtunk. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

III. A parietális dura matert és az AMM-t innerváló capsaicin-szenzitív primer afferensek retrográd jelölése

A kísérleti állatokat klorálhidráttal altattuk, majd a véráramlás vizsgálatoknál leírtak szerint feltártuk a parietális dura matert. A dura mater felszínére, az AMM területére 3%-os diaminido-yellow (DY) szuszpenzióból 0,1 µl-t cseppentettünk mikropipettával. A dura mater felszínét ezután gelasponnal fedtük, majd parafilmmel zártuk és a bőrt összevarrtuk. Az állatokat 3 napi túlélés után ismét elaltattuk, majd perfundáltuk és a TG-t eltávolítottuk. TG-ből készített metszeteken TRPV1-CGRP kettős immunhisztokémiai festést végeztünk. A metszetekről digitális kamerával felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal felvételeket készítettünk. Az adatok kiértékelését számítógépes program (Image-Pro Plus) segítségével végeztük.

IV. In vitro CGRP felszabadulás mérése enzyme-linked immunoassay technikával

In vitro dura mater preparátumon mértük a capsaicin, illetve a PAR-2 agonista által kiváltott CGRP felszabadulás mértékét. Kontroll, capsaicin-deszenzibilizált, illetve 6 hetes diabéteszes állatokat thiopentállal altattunk, majd dekapitáltunk. A koponyákat a középvonalban kettévágtuk, az agyféltekéket eltávolítottuk. A koponyaüregeket 400 µl SIF-kal töltöttük meg. A koponyafelekből mikropipettával 5 percenként 3 egymást követő mintát gyűjtöttünk. A mintákban a CGRP koncentráció mérését enzyme-linked immunoassay módszerrel végeztük. A reakció végtermék fotometriásan mért koncentrációja a CGRP koncentrációjával arányos.

A capsaicin által kiváltott CGRP felszabadulás mértékét kontroll, diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes állatokból készült preparátumokon vizsgáltunk. A második inkubációs periódusban capsaicinnal (10^{-5} M) stimuláltuk a CGRP felszabadulást.

A capsaicin-érzékeny rostok szerepének vizsgálatát a PAR-2 aktivációval kiváltott CGRP felszabadulásra kontroll és capsaicin-deszenzibilizált állatokból készült preparátumokon vizsgáltunk. Ezekben a kísérletekben a második inkubációs periódusban SLIGRL-NH₂-dal (10^{-4} M) stimuláltuk a CGRP felszabadulást.

Eredmények és következtetések

I. Capsaicin-szenzitív afferensek patkány kemény agyhártyájában

Capsaicin-szenzitív szenzoros neurogén vaszkuláris reakciók patkány dura materben

Capsaicin 5×10^{-8} és 10^{-7} M koncentrációban szignifikáns véráramlás fokozódást okozott az AMM ágaiban ($13,5 \pm 8,1\%$ és $18,5 \pm 5,1\%$ véráramlás fokozódás). A capsaicin (10^{-7} M) által kiváltott véráramlás növekedés az 5 perces applikáció 2.-3. percében volt a legmagasabb és az oldat eltávolítása után $4 \pm 1,2$ percen belül visszatért az alapértékre. Magasabb, 10^{-6} és 10^{-5} M koncentrációkban alkalmazva a capsaicin azonnali, szignifikáns véráramlás csökkenést okozott ($21,9 \pm 6,4\%$ és $27,9 \pm 7,1\%$ véráramlás csökkenés), mely a capsaicin eltávolítása után $5 \pm 0,6$, illetve $12 \pm 0,8$ perc alatt tért vissza a kiindulási értékre. A capsaicin hatása minden alkalmazott koncentrációban ismételhetőnek bizonyult. Három egymást követő applikáció során a kiváltott válaszok között szignifikáns különbség nem volt kimutatható. A capsaicin oldószere nem okozott szignifikáns változást a véráramlásban ($3 \pm 1,5\%$ - növekedés). A capsaicin applikációja nem befolyásolta az állatok vérnyomás értékeit (93 ± 5 vs. 91 ± 3 Hgmm a capsaicin applikáció előtt, illetve azt követően).

A TRPV1 receptor capsaicin által kiváltott meningeális érreakciókban betöltött szerepét bizonyítja, hogy a TRPV1 antagonistá capsazepinnel történő előkezelés teljes mértékben blokkolta a capsaicin által kiváltott vazodilatációt ($14 \pm 3,4\%$ véráramlás fokozódás vs. $3 \pm 1,3\%$ csökkenés). A capsazepinnel történő előkezelés a capsaicin (10^{-5} M) által kiváltott vazokonstriktiót azonban szignifikánsan nem befolyásolta ($30,8 \pm 7,7$ vs. $25,7 \pm 6,4\%$ véráramlás csökkenés). A capsaicin által kiváltott vazokonstriktióban nem specifikus kation csatornák aktiválódása játszhat szerepet, mivel a nem specifikus csatornablokkoló RR előzetes applikációja szignifikánsan csökkentette a capsaicin által kiváltott vazokonstriktiót ($27,3 \pm 3,7$ vs. $9,1 \pm 3,6\%$ véráramlás csökkenés).

A CGRP-nek a capsaicin által kiváltott vazodilatációban betöltött szerepét a CGRP antagonistá CGRP₈₋₃₇ előkezeléssel vizsgáltuk, mely a capsaicin által indukált $13,8 \pm 2,1\%$ -os véráramlás növekedést $3,9 \pm 4,3\%$ -ra mérsékelte.

Az erek reakciókészségét a kísérletekben a HA és az ACh vazodilatátor hatásának mérésével igazoltuk ($12,8 \pm 3,4\%$, illetve $11,5 \pm 0,7\%$ véráramlás fokozódást mértünk).

TRPV1-immunreaktivitás patkány dura mater encephaliban és ganglion trigeminaleban

A patkány kemény agyhártyájában jelentős számú TRPV1-IR rost vizualizálható mind az erek körüli ($51,16 \pm 6,13$ metszéspont/mm²), mind pedig az avaszkuláris régiókban ($39,44 \pm 8,57$ metszéspont/mm²). TRPV1 és CGRP ellenes antitestek együttes alkalmazásával kimutattuk, hogy a TRPV1-IR rostok nagy arányban tartalmaznak CGRP-et. (TRPV1-CGRP kettősjelölt rostok metszéspontjainak száma $63,16 \pm 6,13$, a csak TRPV1-IR-t mutató rostok metszéspontjainak száma $6,16 \pm 6,13$ metszéspont /mm² volt).

Patkány trigeminális neuronok $17,9 \pm 2,11\%$ -a expresszálja a TRPV1 receptort. Morfometriai elemzés alapján főként a kis, illetve a közepes méretű ($\leq 600 \mu\text{m}^2$) trigeminális neuronok mutattak TRPV1-immunreaktivitást. A TRPV1-IR trigeminális neuronok többsége CGRP-et tartalmazott, ami alátámasztja a dura materben megfigyelt jelentős kolokalizációt.

A parietális dura matert és az AMM-t innerváló capsaicin-szenzitív trigeminális neuronok kimutatása

Az AMM környékét innerváló neuronok retrográd jelölését követően az ipszilaterális TG-ban átlagosan $36 \pm 4,3$ db jelölt sejtet találtunk. A TRPV1 antitesttel végzett festés eredménye szerint az AMM területét beidegző primer szenzoros neuronok jelentős számban expresszálják a TRPV1 receptort (36 DY-pozitív sejtből 19 volt TRPV1-DY kettősen jelölt). A kettősen jelölt sejtek között találtunk CGRP-immunreaktivitást is mutató sejteket, ami bizonyítja az AMM területét beidegző CGRP-tartalmú capsaicin-szenzitív primer szenzoros neuronok előfordulását a TG-ban.

II. Capsaicin-szenzitív afferensek szerepe a PAR-2 aktiváció által kiváltott meningeális vaszkuláris reakciókban

PAR-2 aktiváció által kiváltott vaszkuláris reakciók patkány dura mater encephaliban

A PAR-2 aktivátor tripszin, illetve a szelektív PAR-2 agonista SLIGRL-NH₂ applikációja dóziszfüggő véráramlás növekedést okozott az AMM ágaiban. A PAR-2 agonista SLIGRL-NH₂ (10^{-5} M) 5 perces applikációja $16 \pm 1,8\%$ -os véráramlás fokozódást váltott ki, mely ismételt applikáció során is változatlan maradt. CGRP receptor antagonistával, illetve L-NAME-rel történő előkezelés szignifikánsan csökkentette a PAR-2 agonista által kiváltott vazodilatációt ($17,1 \pm 2,1\%$ -ról $7,7 \pm 2,6\%$ -ra, illetve $16,7 \pm 1,8\%$ -ról $6,2 \pm 1,2\%$ -ra mérsékelte).

Kísérleteinkben vizsgáltuk a capsaicin-szenzitív meningeális afferensek szerepét a PAR-2 agonista által kiváltott vazodilatációban. A PAR-2 receptor aktiválása, ellentétben a kontroll állatokban tapasztaltakkal, capsaicin-deszenzibilizált állatokban nem vezet szignifikáns véráramlás növekedéshez ($16,19 \pm 0,9\%$ vs. $3,4 \pm 1,2\%$ véráramlás fokozódás).

Bár sem a capsaicin 10^{-8} M, sem a SLIGRL-NH₂ 10^{-6} M koncentrációban alkalmazva nem vált ki szignifikáns vazodilatációt az AMM ágaiban ($1,8 \pm 4,5\%$, illetve $2,5 \pm 3,9\%$ véráramlás fokozódás), a SLIGRL-NH₂ (10^{-6} M) előkezelés szignifikánsan fokozta a capsaicin (10^{-8} M) vazodilatációs hatását ($8,3 \pm 2,1\%$ véráramlás fokozódást mértünk).

A két receptor együttműködésének feltételezett morfológiai alapját immunhisztokémiai vizsgálatokban igazoltuk: a meningeális idegrostok jelentős számában kimutattuk a TRPV1- és a PAR-2-immunreaktivitás kolokalizációját.

Kontroll és capsaicin-deszenzibilizált állatokon mértük a PAR-2 aktiválással kiváltott CGRP felszabadulás mértékét. Az *in vitro* dura mater preparátumban az első 5 perces inkubációs periódus során felszabaduló CGRP mennyisége kontroll és capsaicin-deszenzibilizált állatokban nem mutatott szignifikáns különbséget. Kontroll állatokban a PAR-2 agonista szignifikánsan megnövelte a felszabaduló CGRP mennyiségét, míg deszenzibilizált állatokban nem vezetett a CGRP felszabadulás növekedéséhez ($33,6 \pm 13,3\%$ vs. $2,76 \pm 5,4\%$ növekedés az alapértékhez viszonyítva). A harmadik mintában a mért CGRP koncentráció mindkét állatcsoportban visszatért a kiindulási értékre.

III. Streptozotocin által indukált diabetes mellitus hatása a capsaicin-szenzitív meningeális afferensek működésére és morfológiájára

A capsaicin-szenzitív neurogén vazodilatáció károsodása kísérletes diabetes mellitusban

Diabéteszes patkányokban a capsaicin által kiváltott vazodilatáció mértéke a streptozotocin injekció után 2, illetve 4 héttel változatlan volt, 6 héttel a kezelést követően azonban már nem volt megfigyelhető ($9,4 \pm 2,8$ és $12 \pm 1,8\%$ növekedés vs. $5,9 \pm 2,1\%$ véráramlás csökkenés). Inzulinnal kezelt 6 hetes diabéteszes állatokban a capsaicin vazodilatációs hatása hasonló volt a kontroll értékekhez ($15 \pm 2,9\%$ véráramlás fokozódás). 6 héttel a streptozotocin injekciót követően a HA-nal és ACh-nal kiváltott vazodilatáció mértéke megegyezett a kontroll állatokban mért értékekkel, ami arra utal, hogy a csökkent válaszok kialakulásában az endotheliális mechanizmusok esetleges károsodása nem játszik szerepet.

A TRPV1-immunreaktív rostok mennyiségének csökkenése kísérletes diabetes mellitusban

Kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálatainkban kimutattuk, hogy diabéteszes állatokban szignifikánsan csökkent a dura mater idegrostjainak száma: a diabétesz kiváltása után 6 héttel csökkent a meningeális TRPV1-IR rostok száma (kontroll: $51,1 \pm 6,1$ vs. diabéteszes: $19,76 \pm 2,28$ metszéspont/mm²). A csökkenés mind a perivaszkuláris, mind az avaszkuláris területeken megfigyelhető volt.

Capsaicin által kiváltott CGRP felszabadulás csökkenése kísérletes diabetes mellitusban

Kontroll, 6 hetes diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes állatokon mértük a capsaicin által indukált CGRP felszabadulás mértékét. A dura mater preparátumokból az első 5 perces inkubációs periódus során felszabaduló CGRP mennyisége nem mutatott szignifikáns különbséget a három állatcsoportban. A capsaicin hatására felszabaduló CGRP mennyisége azonban a diabéteszes állatokban szignifikánsan, $31,9 \pm 7,6\%$ -kal elmaradt a kontroll mintákban mért értéktől. Inzulinnal kezelt diabéteszes állatokban a capsaicin által indukált CGRP felszabadulás mértéke a kontrollhoz hasonló volt (a kontroll állatokban mért érték $93,3 \pm 4,9\%$ -a). A harmadik mintában a mért CGRP koncentráció mindhárom állatcsoportban visszatért a kiindulási értékre.

Összefoglalás és következtetések

Kísérleteink során morfológiai és funkcionális módszerekkel igazoltuk a capsaicin-szenzitív afferens idegek jelenlétét patkány kemény agyhártyájában. Figyelembe véve a capsaicin-szenzitív érző afferensek nociceptív funkcióját és azt, hogy a kemény agyhártya az egyetlen jelentős intrakraniális fájdalomérző struktúra, erősen valószínűsíthető, hogy a capsaicin-szenzitív, TRPV1-IR meningeális idegrostok szerepet játszanak a fejfájások patomechanizmusában. Vizsgálataink bizonyították, hogy a capsaicin-szenzitív nociceptív idegek lokális regulatorikus (efferens) funkciójuk révén szerepet játszanak a kemény agyhártya vaszkuláris reakcióinak kialakulásában. Kimutattuk, hogy az AMM-t, illetve annak környékét beidegző capsaicin-szenzitív primer szenzoros neuronok vazodilatátor hatású CGRP-et tartalmaznak.

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a capsaicin-szenzitív idegek szerepet játszanak a PAR-2 aktiválódását kísérő vazodilatáció kialakulásában. Megállapítottuk, hogy a meningeális PAR-2 aktivációja CGRP- és NO-függő vazodilatációt vált ki patkány dura mater encephaliban, amely részben a capsaicin-szenzitív meningeális afferensek aktiválódásának és/vagy szenzitizációjának következménye.

Kísérletes diabetes mellitusban csökkentnek találtuk a TRPV1 receptort expresszáló meningeális idegrostok számát és jelentősen csökkent az aktiválásukkal kiváltható vazodilatáció mértéke. Eredményeink szerint ezek a változások a streptozotocin-kezeléssel kiváltott diabéteszes állapot következtében alakulnak ki, mivel az inzulin-kezelés hatására mind a capsaicin vazodilatátor hatása, mind pedig a CGRP felszabadulás mértéke megtartott maradt. A neurogén szenzoros vazodilatáció károsodásának patofiziológiai jelentősége a gyulladásos metabolitok eltávolítását szolgáló anti-inflammatorikus, protektív vazodilatációs folyamatok zavarához vezethet, ami magyarázhatja a diabéteszes betegek fejfájással kapcsolatos fokozott panaszait. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a capsaicin-szenzitív érző neuronok fontos szerepet játszanak a kemény agyhártya nociceptív és szenzoros vazomotor működésében és a fejfájások patofiziológiai folyamataiban. Eredményeink, a capsaicin-szenzitív afferens idegek működésének farmakológiai befolyásolása révén, felvetik a fejfájások kezelésének új lehetőségeit is.

Irodalomjegyzék:

1. Dux M, Sántha P, Jancsó G (2003) Capsaicin-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the dura mater of the rat. *J Physiol* 552:859-867.
2. Moskowitz MA (1990) Basic mechanisms in vascular headache. *Neurol Clin* 8:801-815.
3. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6:151-158.

Köszönetnyilvánítás

Megkülönböztetett köszönettel tartozom Jancsó Gábor Professzor Úrnak, hogy lehetőséget adott arra, hogy az Élettani Intézet Funkcionális Neuromorfológia Laboratóriumának munkájába bekapcsolódhassak és köszönöm a munkámhoz nyújtott minden segítségét. Hálásan köszönöm Dr. Dux Máriának az elmúlt évek alatt munkámnak tulajdonított figyelmét és sok segítségét. Szeretném megköszönni munkatársaimnak Dr. Sántha Péternek, Kisné Dobos Ildikónak, Dr. Boros Krisztinának, Tenkné Hegyeshalmi Évának és Dr. Horváth Viktornak segítségüket és figyelmüket, amellyel hozzájárultak dolgozatom elkészültéhez. Továbbá köszönöm Jász Anikónak, Liszli Péternek, Hermann Kálmánnak és az intézet összes dolgozójának az elmúlt évek alatt munkámhoz nyújtott segítségét.

Külön szeretném megköszönni Oszlács Orsolyának az elmúlt években nyújtott baráti segítségét és támogatását, amely nélkülözhetetlen volt munkámhoz. Köszönettel tartozom továbbá családomnak, hogy biztosították számomra a munkámhoz szükséges nyugodt családi háttérrel és köszönöm sok éves támogatásukat.

A tézisek alapjául szolgáló publikációk

- I. M. Dux, J. Rosta, G. Jancsó. Dysfunction of meningeal capsaicin-sensitive afferent nerves in a rat model of diabetic neuropathic pain. *European Journal of Pain* 11 (Suppl 1) S167-S168, 2007
- II. M. Dux, J. Rosta, S. Pintér, P. Sántha, G. Jancsó. Loss of capsaicin-induced meningeal neurogenic sensory vasodilatation in diabetic rats. *Neuroscience* 150: 194-201, 2007
- III. M. Dux, J. Rosta, P. Sántha, G. Jancsó. Activation of PAR-2 mediates neurogenic vasodilatory responses and nociceptor function in the rat dura mater. *Neuroscience* 161: 887-94, 2009
- IV. J. Rosta, G. Jancsó, M. Dux. Activation of proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) induces meningeal vasodilation and modulates nociceptor function. *Neuropeptides* 43: 438-439, 2009